



TITLE:

# ヒト腎細胞癌の転移における宿主線維芽細胞の役割: 宿主線維芽細胞によるヒト腎細胞癌のType 4collagenase産生調節について

AUTHOR(S):

郷司, 和男; 守殿, 貞夫

---

CITATION:

郷司, 和男 ...[et al]. ヒト腎細胞癌の転移における宿主線維芽細胞の役割: 宿主線維芽細胞によるヒト腎細胞癌のType 4collagenase産生調節について. 泌尿器科紀要 1994, 40(10): 909-917

ISSUE DATE:

1994-10

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/115370>

RIGHT:

# ヒト腎細胞癌の転移における宿主線維芽細胞の役割 宿主線維芽細胞によるヒト腎細胞癌の Type IV collagenase 産生調節について

神戸大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 守殿貞夫 教授)

郷司 和男\*, 守殿 貞夫

## ROLE OF ORGAN SPECIFIC FIBROBLASTS IN METASTASIS OF HUMAN RENAL CELL CARCINOMA: REGULATION OF TYPE IV COLLAGENASE PRODUCTION FROM HUMAN RENAL CELL CARCINOMA BY ORGAN SPECIFIC FIBROBLASTS

Kazuo Gohji and Sadao Kamidono

*From the Department of Urology, Kobe University School of Medicine*

An orthotopic metastatic human renal cell carcinoma model in nude mice was established to evaluate the mechanism of metastasis as a preliminary phase in the development of a treatment to prevent cancer metastasis. The effect of host fibroblasts from different organs on the production of type IV collagenase by human renal cell carcinoma and the factors which influenced the enzyme production and secretion by fibroblasts were also investigated. KG-2 cells were established from human renal cell carcinoma, and produced tumors following implantation to both the subrenal capsular space (orthotopic site) and subcutis (ectopic site). Histologically, the tumors in the subcutis (SC tumors) were well encapsulated with a thick fibrous capsule and did not produce metastasis or invasion, whereas those in the subrenal capsular space (SRC tumors) lacked a fibrous capsule and produced metastasis at the lung or regional lymph nodes. The production of type IV collagenase in conditioned media from metastatic SRC tumors and lung metastatic lesions was larger than that from non-metastatic SC tumors. The conditioned media separated from mouse kidney or lung fibroblasts stimulated the production of type IV collagenase by KG-2 cells, whereas, that separated from mouse skin fibroblasts decreased the enzyme production. The production of type IV collagenase by KG-2 cells was stimulated by cocultured KG-2 cells and fibroblasts from the kidney or lung, whereas it was suppressed by cocultured KG-2 cells and skin fibroblasts. Our findings demonstrate that the orthotopic implantation of KG-2 cells to the SRC in nude mice is useful in understanding the mechanism of metastasis and may have application in the development of treatment for metastatic human renal cell carcinoma. Among cytokines and growth factors tested, transforming growth factor- $\beta_1$ , basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor stimulated type IV collagenase production by KG-2 cells. Transforming growth factor- $\beta_1$  which secreted by host fibroblasts from the kidney (orthotopic site) and lung (the most frequent metastatic site) influence the metastasis of human renal cell carcinoma by increasing type IV collagenase production.

(Acta Urol. Jpn. 40: 909-917, 1994)

**Key words:** Human renal cell carcinoma, Metastasis, Type IV collagenase, Fibroblasts, TGF- $\beta_1$

### 緒 言

腎細胞癌は、泌尿器科領域の悪性腫瘍のうち膀胱

\* 現: 兵庫県立成人病センター泌尿器科

癌、前立腺癌について多いが、制癌化学療法、免疫療法および放射線療法は無効で、手術療法のみが有用とされる。従って転移を有する進行例の予後はきわめて不良である。そこで、外科的切除後の再発を最小限に

とどめることが本症の予後改善に有用と思われる。今回われわれは腎細胞癌術後再発予防に何らかの糸口をみつけるため、宿主由来線維芽細胞が腎細胞癌細胞の type IV collagenase 産生能におよぼす影響について検討するとともに腎細胞癌の転移を阻止する可能性のある因子につき検討した。

## 材料と方法

### 1. ヒト腎細胞癌細胞とマウス各臓器由来線維芽細胞:

癌細胞は、われわれが樹立したヒト腎細胞癌由来株細胞 KG-2 を用いた<sup>1)</sup>。その樹立経過および生物学的特性はすでに報告したのでここでは略す。マウス線維芽細胞は次のようにして樹立された。すなわち、8週齢雄ヌードマウスより肺、皮膚、腎臓を無菌的に摘出した後、約 1/mm<sup>3</sup> の大きさに細切する。その後 270U/ml の DNase および 200U/ml の collagenase type I (ともに Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) の混合液中で 37°C, 30分間攪拌し滅菌 4 層ガーゼで濾過した後、細胞浮遊液を Hank's balanced salt solution (HBSS: GIBCO, Grand Island, NY) で 2 度洗浄し 10% fetal bovine serum (FBS) 含有 Eagle's minimum essential media (EMEM, GIBCO, NY) で培養し、0.02% EDTA と 0.25% trypsin (ともに SIGMA; MO) 混合液を作用させ、継代培養を続けた。数回継代培養を繰り返すことにより紡錘型より成る細胞を樹立し、その形態および染色体分析によりマウス由来正常線維芽細胞と考えられた。本実験では第10代までのものを用いた。

### 3. KG-2 細胞のヌードマウスへの皮下および腎被膜下移植:

ヌードマウスの皮下および腎被膜下移植はすでに報告した方法に準じて行った<sup>1)</sup>。すなわち、対数増殖期にある第5代目 KG-2 培養細胞の単離細胞浮遊液を作成し、 $1 \times 10^6$  生細胞/0.05 ml HBSS を 27 G needle 付注射器を用いて 8 週齢、雄ヌードマウスの皮下および腎被膜下へ移植した。KG-2 細胞を移植した後、皮下腫瘍が長径約 2 cm となった時あるいは移植後 3 カ月目にマウスを屠殺し、形成された腫瘍および全臓器を摘出し肉眼的および組織学的に腫瘍組織型および転移の有無を検討した。

### 4. ヌードマウスに形成され腫瘍の type IV collagenase 活性

a) Zymography: ヌードマウスの皮下および腎被膜下に形成された腫瘍を無菌的に摘出し、1 mm<sup>3</sup> 角大に細切し腫瘍重量 100 mg に対して 10 ml の serum-free F-12/DMEM (GIBCO; NY) を加え 37°C で

培養を開始する。24時間後、培養上澄を集め 800×g で10分間遠沈後、上澄をさらに 18,000×g で10分間遠沈しその上澄を gelatin zymography に用いた。gelatin zymography は既報の通り中島らの方法に準じて行った<sup>3)</sup>。すなわち、培養上澄 1 ml を centricon 30 microconantrators (American Corporation, Beverly, MA) で約20倍に濃縮した後、1 mg/ml gelatin (SIGMA; MO) を含む 7.5% acrylamide gel 上で電気泳動を行った。泳動後、gel を rinsing buffer 中で 2 度洗浄後、incubation buffer 中で 37°C 16時間静置する。その後 0.05% Coomassie blue で染色後、脱染色を行った。gelatinase (type IV collagenase) により digestion された gelatin は Coomassie blue で染色後透明なバンドとして表わされる。Gel を乾燥後 negative film に焼き付け、Pharmacia LKB-Ultrascan XL laser densitometer を用いて各バンドの強度を測定し定量化した。

b) 免疫組織学的検討: 腫瘍を摘出し、Tissue TEK, O.C.T. Compound (Miles Laboratory, ELKHart, Ind) を満たした直径 20 mm のアルミ製容器に腫瘍片を入れ、液体窒素を用いて急速冷凍後 IEC minotome cryostat で薄切し、中島らの方法<sup>3)</sup>に準じてスライドガラス上に組織を固定後 72 KDa 抗ヒト collagenase type IV 抗体 (National cancer Institute の Lance A Liota 博士より供与) を 1h 反応させ、対染色として Mayar's hematoxylin 染色を施した。

### 5. マウス各臓器由来線維芽細胞の培養上澄が KG-2 細胞の type IV collagenase 産生におよぼす影響:

直径 10 mm の tissue petridish におよそ 80% confluent となったマウス肺、腎および皮膚線維芽細胞を HBSS で軽く 2 度すすいだ後、5 ml の serum free F-12/DMEM を加え 24時間培養をする。24時間後、培養上澄を採取し、1,000×g で 5分間遠沈後マウス線維芽細胞自身が産生した type IV collagenase を除去する目的で gelatin-sepharose colum (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) を通し、その後 0.45 μm millipore filter を通して -70°C で凍結保存する。一方、KG-2 細胞 ( $1 \times 10^6$  個) を 75 mm<sup>2</sup> flask に播種し 10% FBS 含有 EMEM 中で培養する。24時間後 flask を 10 ml の serum-free F-12/DMEM 培地で軽くすすぎ、新しく serum-free F-12/DMEM を 5 ml と先に保存しておいた線維芽細胞培養上清を 5 ml 加えさらに 24時間培養を続けた。また serum-free F-12/DMEM のみ 10 ml 加えたものを対照とした。24時間後培養上澄を採取し、

遠沈をその 2 ml ( $2.5 \times 10^5$  生細胞の培養上澄に相当) を gelatin zymography に用いた。

6. KG-2 細胞とマウス各臓器由来線維芽細胞同時培養系における type IV collagenase 産生:

マウス肺, 腎および皮膚由来線維芽細胞を直径 30 mm の tissue culture dish に培養し confluent となった時,  $2.5 \times 10^5$  個の KG-2 細胞を重層播種する。24 時間, 10% FBS 含有 EMEM 中で培養後 dish を 3 度 serum-free F-12/DMEM ですすぎ 2.5 ml serum-free F-12/DMEM を加え培養を続け 24 時間後に培養上澄を採取し gelatin zymography に用いた。また対照群として, 各線維芽細胞, あるいは KG-2 細胞単独培養上澄を用いた。

7. 各種 cytokine および growth factor が KG-2 細胞の type IV collagenase 産生におよぼす影響:

$2 \times 10^5$  細胞の KG-2 細胞を直径 30 mm tissue culture petridish に播種し, 10% FBS 含有 EMEM 中で 24 時間培養する。その後 petridish を serum-free F-12/DMEM で軽くすすぎ, cytokine および growth factor を含む serum-free F-12/DMEM を 2.5 cc 加え 24 時間培養し上澄を gelatin zymography に用いた。また対照群として cytokine および growth factor を含まない serum-free F-12/DMEM を 2.5 cc 加えたものを用いた。同時に各 cytokine および growth factor 存在下で培養した KG-2 細胞の生細胞数を算出し, これら cytokine および growth factor が KG-2 細胞の増殖におよぼす影響も検討した。今回用いた cytokine および growth factor の種類と濃度を Table 1 に示す。

8. マウス線維芽細胞により産生される growth factor の免疫学的解析:

マウス肺, 腎および皮膚由来線維芽細胞 ( $1 \times 10^4$  個) を Lab Tek chamber slide (Nunc, Naperville, IL) に播種し, 10% FBS 含有 EMEM 中で 72 時間培養した。Lab Tek chamber slide を PBS で 3 度すすぎ, acetone と chloroform の混合液で 5 分固定し, 1% ヤギ血清および 1% ウマ血清を含む PBS で 20 分間 incubate する。その後線維芽細胞は anti-bovine basic FGF type I monoclonal IgG1 (Vpstate Biotechnology, Inc, Lake Placid, NY), rabbit polyclonal anti-TGF- $\beta_1$  antibody (R & D System, Minneapolis, MN) あるいは, mouse monoclonal anti-HGF (関西医科大学, 北村直美博士より供与) を加えて 4°C, overnight で incubate した。翌日 slide を PBS ですすぎ gold labeled secondary antibodies (Amersham, Arlington Heights, IL) で室温で 1 時間 incubate した。数回 slide を PBS ですすいだ後, スライドを 2% glutaraldehyde で 10 分間固定し蒸留水ですすいだ。スライドは Mayer's hematoxylin 染色を用いた対染色され crystal mount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) を用いてマウントした後, 蛍光顕微鏡下に観察した。

Table 1. Gelatinolytic activity secreted by KG-2 cultured cells treated with various cytokines and growth factors

Factors	Concentrations	REA <sup>1)</sup>
TGF- $\beta_1$	1.0 pg/ml	1.07
	10	1.74
	100	2.83
EGF	1.0 ng/ml	1.10
	10	1.24
	100	1.13
PDGF	1.0 ng/ml	1.10
	10	0.90
	100	1.00
bFGF	1.0 ng/ml	2.00
	10	4.84
	100	4.53
HGF	1.0 ng/ml	1.76
	10	3.04
	100	3.54
G-CSF	1.0 ng/ml	1.04
	10	1.02
	100	1.02
M-CSF	1.0 ng/ml	1.00
	10	1.02
	100	0.94
GM-CSF	1.0 ng/ml	1.02
	10	1.03
	100	1.08
TNF- $\alpha$	1.0 U/ml	1.10
	10	1.00
	100	1.20
IL-1 $\beta$	1.0 U/ml	1.10
	10	1.00
	100	1.20

1) REA; relative gelatinolytic activity. The average integrated intensity of three individual experiments is shown as a relative gelatinase level (SD < 17%). The gelatinase activity of KG-2 cells growing in control media = 1.0. TGF- $\beta_1$ : human recombinant transforming growth factor- $\beta_1$  (Ajinomoto, Tokyo Japan), EGF: human recombinant epidermal growth factor, PDGF: human recombinant platelet derived growth factor, bFGF: human recombinant basic fibroblast growth factor (共に Collaborative Res, Bedford, MN), HGF: human recombinant hepatocyte growth factor (Toyobo, Osaka Japan), G-CSF: human recombinant granulocyte colony stimulating factor, CM-CSF: human recombinant granulocyte monocyte colony stimulating factor, M-CSF: human recombinant monocyte colony stimulating factor (共に Kirin Brewery Co., Ltd, Tokyo Japan), TNF- $\alpha$ : human recombinant tumor necrosis factor- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ : human recombinant interleukin-1- $\beta$  (共に Boehringer-Mannheim Indianapolis, IN).

ghts, IL) で室温で 1 時間 incubate した。数回 slide を PBS ですすいだ後, スライドを 2% glutaraldehyde で 10 分間固定し蒸留水ですすいだ。スライドは Mayer's hematoxylin 染色を用いた対染色され crystal mount (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) を用いてマウントした後, 蛍光顕微鏡下に観察した。



## 結 果

### 1. ノードマウスにおける KG-2 細胞の造腫瘍能と転移能：

Ectopic site (皮下) および orthotopic site (腎被膜下) に移植された KG-2 細胞は造腫瘍能に差を認めなかった。しかし、移植部位別転移能を検討すると、腎被膜下に形成された腫瘍は75%の例で肺あるいは腎門部リンパ節へ遠隔転移をきたし、転移の好発部位は肺でその転移結節数は2~40個(中央値; 9個)で

あった。他方、皮下に形成された腫瘍は1例も転移巣を形成しなかった (Table 2)。

### 2. ノードマウスに形成された KG-2 腫瘍の産生する type IV collagenase 活性：

ノードマウスの皮下、腎被膜下に形成された腫瘍および肺転移巣の産生する type IV collagenase の zymography を Fig. 1 に示す (Fig. 1)。Type IV collagenase の産生は肺転移巣で最も高く、ついで腎被膜下腫瘍、皮下腫瘍の順であった。腎被膜下腫瘍、および肺転移巣の type IV collagenase 活性値を転

Table 2. Tumorigenicity and metastatic behavior of KG-2 tumors growing at different injection sites of nude mice

Injection sites	Tumorigenicity (%)	Incidence of metastasis (%)	Lung metastasis			Lymphnode	Ascites
			Incidence	Median	Range		
SRG <sup>1)</sup>	12/16 (75)	9/12 (75)	9/12	9	2-40	1/12	2/12
SC <sup>1)</sup>	12/16 (75)	0/12 (0)	0/12				

1) SRC ; Subrenal capsular space (orthotopic site), 2) SC ; Subcut site (ectopic site).

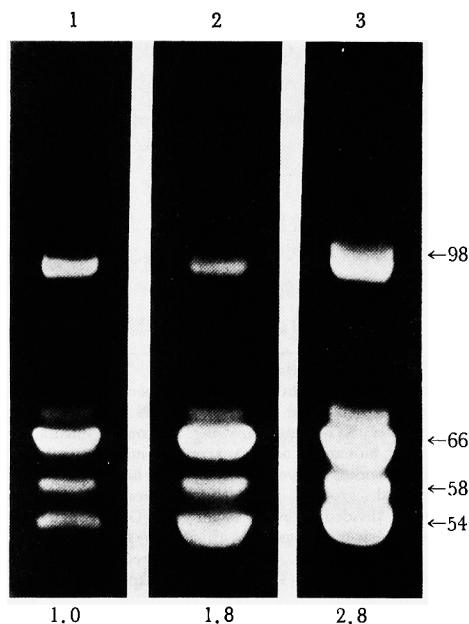


Fig. 1. Gelatinolytic activity in conditioned media from KG-2 tumors produced in nude mice. Lane 1, non-metastatic SC tumors; Lane 2, metastatic SRC tumors; Lane 3, lung metastatic lesion. The numbers at the right side show the molecular weight. The number at the bottom of each lane indicates the relative gelatinolytic activity, which is defined by dividing the gelatinolytic activity of the SRC or lung metastatic lesion by that of the non-metastatic SC tumors.

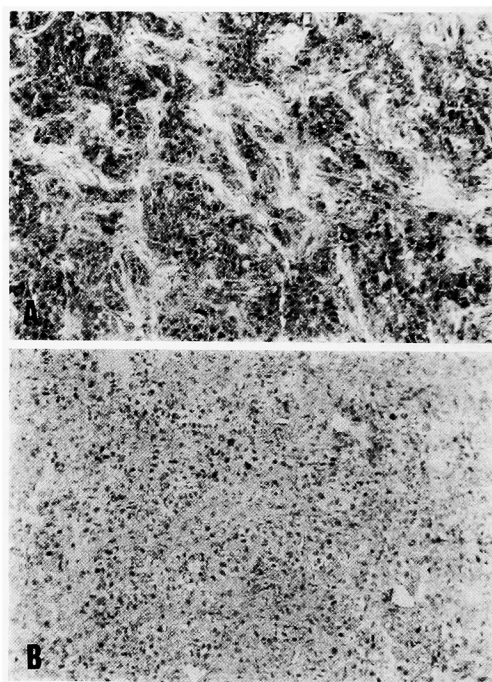


Fig. 2. Immunohistochemistry of SC and SRC tumors produced in nude mice with 72 KDa type IV collagenase antibody. A, metastatic SRC tumors; B, non-metastatic SC tumors. The expression of 72KDa type IV collagenase in SRC tumors is more extensive than that in SC tumors ( $\times 200$ ).

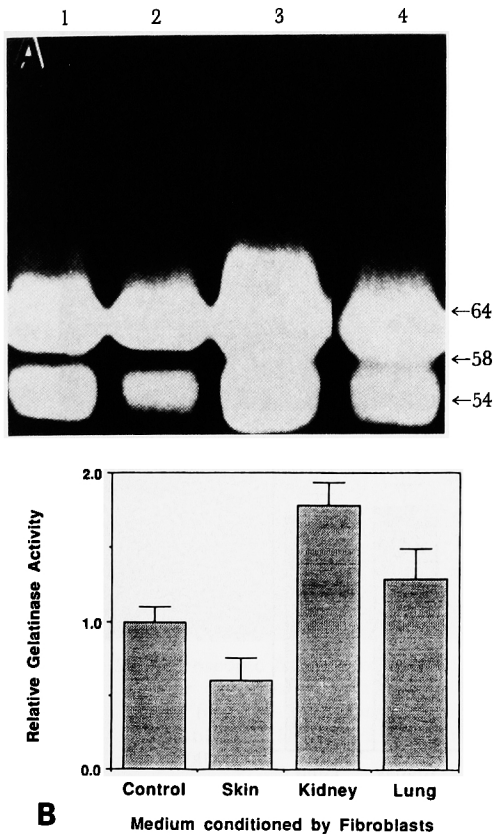


Fig. 3. Influence of conditioned media from fibroblasts on gelatinolytic activity of KG-2 cells. A, gelatin zymography: lane 1: KG-2 cells alone; lane 2: KG-2 cells with conditioned media from mouse skin fibroblasts; lane 3: KG-2 cells with conditioned media from mouse kidney fibroblasts; lane 4: KG-2 cells with conditioned media from mouse lung fibroblasts. The number at the right side demonstrates molecular weight. B, relative gelatinolytic activity: relative gelatinolytic activity was defined as follows: the gelatinolytic activity in conditioned media from KG-2 cells with conditioned media of mouse fibroblasts was divided by that in conditioned media from KG-2 cells without conditioned media of mouse fibroblasts.

移をきたさない皮下腫瘍の type IV collagenase 活性値で割ったものを relative gelatinolytic activity (RGA) とすると腎被膜下腫瘍および皮下腫瘍の RGA は、各 1.8 および 2.8 であった。また 72 KDa type IV collagenase 抗体を用いた免疫組織学的検討では転移巣を形成する腎被膜下腫瘍では 72 KDa type IV collagenase 活性の強い発現を認めたが、転

移を形成しない皮下腫瘍ではその発現の程度は弱かった (Fig. 2)。

3. マウス肺、腎および皮膚由来線維芽細胞の培養上澄が KG-2 細胞の type IV collagenase 産生におよぼす影響:

KG-2 細胞の増殖はいずれのマウス線維芽細胞の培養上澄により影響を受けなかった (data は示さず)。KG-2 細胞はおもに 72 KDa type IV collagenase を産生しており、その活性型として zymography 上、68 KDa と 64 KDa の 2 本の band としてあらわされるが 92 KDa type IV collagenase の産生は著明でなかった (Fig. 3A)。マウス腎および肺由来線維芽細胞の培養上澄は KG-2 細胞の type IV collagenase 産生を促進したのに対し、皮膚線維芽細胞の培養上澄は KG-2 細胞の type IV collagenase 産生を抑制した (Fig. 3A)。その RGA はこれら線維芽細胞の培養上澄を加えなかったときの KG-2 細胞の type IV collagenase 活性を 1.0 とするとマウス皮膚、腎および肺由来線維芽細胞の培養上澄添下時の KG-2 細胞の type IV collagenase 活性は、各 0.6、1.8 および 1.2 であった (Fig. 3B)。

4. KG-2 細胞とマウス各臓器由来線維芽細胞同時培養系における type IV collagenase 活性:

マウス腎および皮膚由来線維芽細胞は 72 KDa および 92 KDa type IV collagenase を肺由来線維芽細胞は 72 KDa type IV collagenase を産生していた。KG-2 細胞とマウス皮膚線維芽細胞同時培養下での培養上澄中の type IV collagenase 活性は KG-2 細胞単独およびマウス皮膚由来線維芽細胞単独培養時の培養上澄中の type IV collagenase 活性の総和より低かった。他方 KG-2 細胞とマウス腎あるいは肺由来線維芽細胞同時培養下での type IV collagenase 活性はそれぞれ単独培養時の type IV collagenase 活性の総和より高かった (Fig. 4A)。RGA は KG-2 細胞単独培養時と各線維芽細胞単独培養時の type IV collagenase 活性の総和を 1.0 とすると KG-2 細胞と皮膚、腎および肺由来線維芽細胞同時培養時の RGA は各 0.4、1.4 および 1.3 であった (Fig. 4B)。また倒立顕微鏡下に KG-2 細胞と各種線維芽細胞の相互作用を検討すると、同時培養開始から 24 時間目に KG-2 細胞は一層に増殖したマウス皮膚線維芽細胞は破壊せず pile up して増殖していたが、腎および肺由来線維芽細胞を破壊するのが観察された (Fig. 5)。

5. Cytokine および growth factor が KG-2 細胞の増殖および type IV collagenase 産生におよぼす影響:

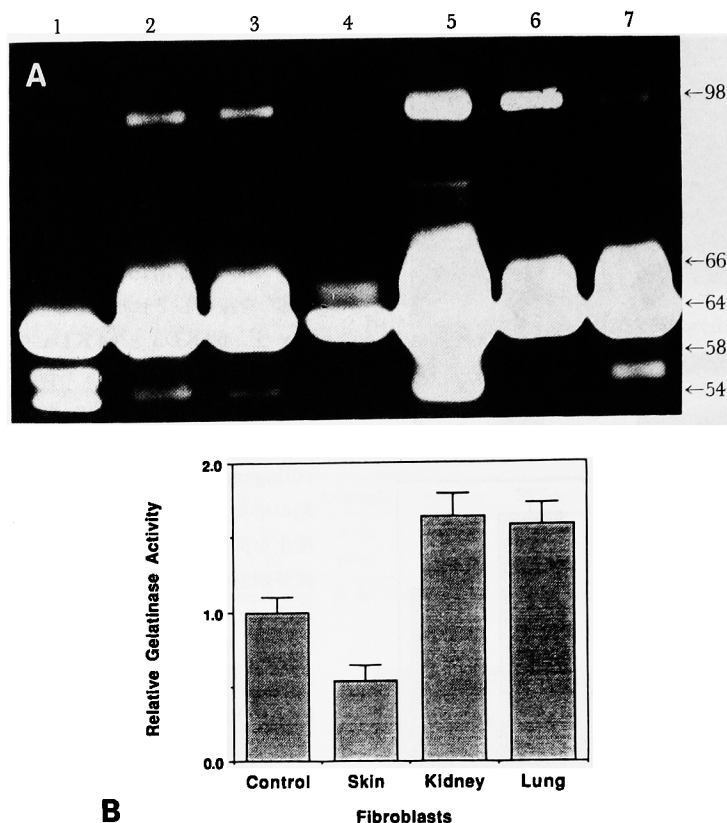


Fig. 4. Gelatinolytic activity in conditioned media from coculture of KG-2 cells and mouse fibroblasts. A; gelatin zymography: lane 1: KG-2 cells alone; lane 2: mouse kidney fibroblasts alone; lane 3: mouse skin fibroblasts alone; lane 4: mouse lung fibroblasts alone; lane 5: KG-2 cells and mouse kidney fibroblasts in coculture; lane 6: KG-2 cells and mouse skin fibroblasts in coculture; lane 7: KG-2 cells and mouse lung fibroblasts in coculture. The number at the right side demonstrates molecular weight. B, relative gelatinolytic activity: relative gelatinolytic activity was defined as follows: gelatinolytic activity in conditioned media from KG-2 cells and mouse fibroblasts in coculture was divided by the total gelatinolytic activity of conditioned media from KG-2 cells alone plus that of conditioned media from mouse fibroblasts alone.

いずれの cytokine および growth factor も今回用いた濃度では KG-2 細胞の増殖に著明な影響を与えなかった (data は示さず). Basic FGF は 0.1, 1.0 および 10 ng/ml で KG-2 細胞の type IV collagenase 産生を無治療群の各 2.0, 4.8 および 4.5 倍に増大した (Table 2). また TGF- $\beta_1$  は各 10 および 100 pg/ml と低濃度で KG-2 細胞の type IV collagenase 産生を各 1.7, 2.8 倍に (Table 2), また HGF は 0.1, 1.0 および 10.0 ng/ml で 1.76, 3.04 および 3.54 倍に増大した. 他方, 他のいずれの cytokine および growth factor も KG-2 細胞の type IV collagenase 産生に影響を与えなかった (Table 1).

6. マウス線維芽細胞が産生する growth factor の

免疫学的解析:

KG-2 細胞の type IV collagenase 産生を促進した bFGF, TGF- $\beta_1$  および HGF のうち TGF- $\beta_1$  は腎および肺由来線維芽細胞の細胞質内に強い発現がみられ, 皮膚由来線維芽細胞ではほとんど発現が認められたが (Fig. 6), bFGF および HGF は線維芽細胞間にその発現の差を認めなかった.

## 考 察

癌の転移成立には, 複数の step を経ることが必須とされる<sup>4)</sup>. この複数の step において extra cellular matrix および血管の基底膜を破壊するのに extracellular matrix degradative enzyme が必須とされ

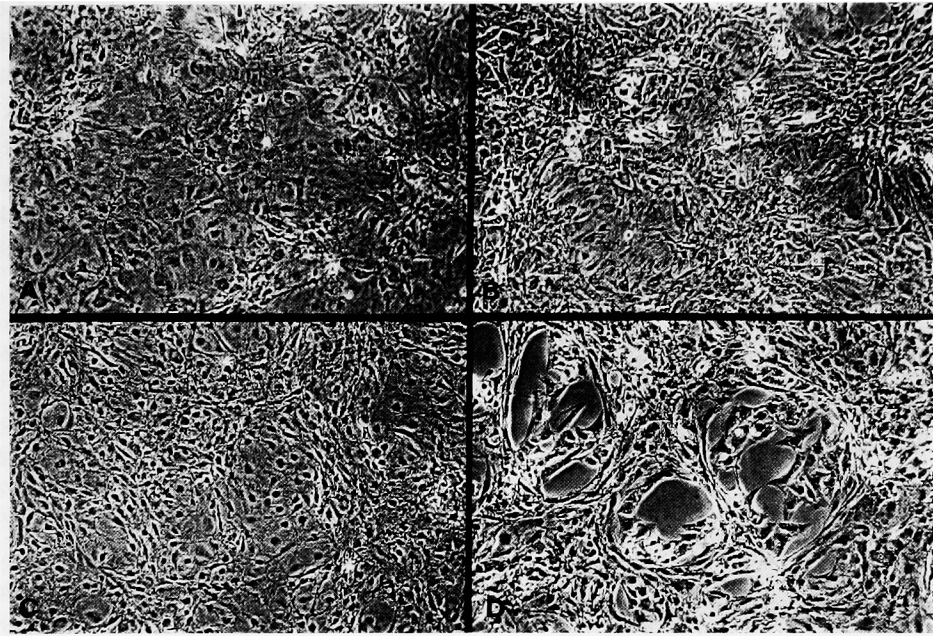


Fig. 5. Microscopic findings of cocultured KG-2 cells and mouse fibroblasts. A: monolayer of mouse skin fibroblasts; B: KG-2 cells growing on a monolayer of mouse skin fibroblasts without fibroblast degradation; C: monolayer of mouse kidney fibroblasts; D: KG-2 cells growing with degradation of mouse kidney fibroblasts ( $\times 200$ ).

る。この enzyme 群のうちなかでも matrix metalloproteinase (MMP) が重要で注目されている<sup>9)</sup>。MMP のなかにはその分子量および生物学的特性により MMP-1 (interstitial collagenase), MMP-2 (type IV collagenase; 分子量 72 KDa), MMP-3 (stromelycin/trancin), MMP-7, MMP-9 (type IV collagenase; 分子量 92 KDa) が存在する。一方、癌細胞をヌードマウスに移植したとき orthotopic site に移植されたときのみ高率に転移をきたすことが知られている<sup>6,7)</sup>。すなわち、ヒト大腸癌細胞は cecum に移植され肝に<sup>6)</sup>、ヒト前立腺癌は前立腺に移植されリンパ節に<sup>7)</sup> いずれも高率に転移をきたすが、ectopic site である皮下に移植しても転移巣を形成しない<sup>6,7)</sup>。このことは癌転移は癌細胞のみならず癌細胞をとりまく周囲の細胞との相互作用により成立されたとする paget の仮説<sup>8)</sup>を強く支持する。そこでわれわれは転移という癌細胞特有の生物学的特性を癌細胞とそれを取りまく宿主の線維芽細胞との相互作用を癌転移成立に必須とされる type IV collagenase の産生に焦点をしばり検討するとともに癌細胞の type IV collagenase 産生に影響をおよぼす線維芽細胞由来の因子につき検討を加えた。今回用いたヒト腎細胞癌株

はすでに報告したように淡明細胞癌から樹立されヌードマウスの皮下への移植では転移浸潤傾向を示さず皮下腫瘍は厚い線維性被膜によく被われており転移浸潤傾向を示さない<sup>1)</sup>。他方、本細胞は腎被膜下への移植で高率に肺に転移をきたし、腎被膜下腫瘍は腎実質と腫瘍の間で線維性被膜を欠いていた<sup>1)</sup>。一方、諸家により type IV collagenase 活性は転移能とよく相関することが示されている<sup>6,9)</sup>。そこでヌードマウスに形成された腫瘍の培養上澄中の type IV collagenase 活性を gelatin zymography を用いて検討したところ、転移巣を形成した腎被膜下腫瘍および肺転移巣の type IV collagenase 活性は、転移を形成しなかった皮下腫瘍のそれに比べ著しく高値であった。また 72 KDa type IV collagenase 抗体を用いた免疫組織学的検討では同様に腎被膜下腫瘍では皮下腫瘍に比べ著しく高い type IV collagenase の発現が認められ、ヌードマウスの移植部位による転移能の違いは type IV collagenase 産生の差によるものであることを強く示唆した。さらにマウスの腎、皮膚および肺由来線維芽細胞が KG-2 細胞の type IV collagenase 産生におよぼす影響を検討したところ、腎および肺線維芽細胞の培養上澄は KG-2 細胞の type IV collag-

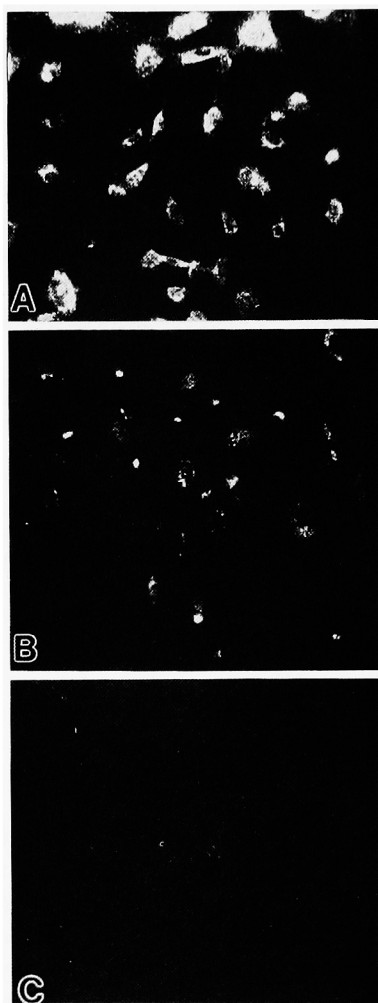


Fig. 6. Immunohistochemical analysis of fibroblasts from various mouse organs with TGF- $\beta$  antibody. A: fibroblasts from mouse kidney; B: fibroblasts from mouse lung; C: fibroblasts from mouse skin. TGF- $\beta$  was strongly expressed in fibroblasts from the kidney and lung, whereas it was weakly expressed in fibroblasts from the skin ( $\times 200$ ).

enase 活性を各 1.8 および 1.2 倍と増大したのに対し皮膚由来線維芽細胞の培養上澄は酵素活性を 0.6 倍と抑制した。また KG-2 細胞を一層に増殖した各臓器由来線維芽細胞に重層させたところ、腎および肺の線維芽細胞は KG-2 細胞の type IV collagenase 活性を促進したが皮膚線維芽細胞は抑制した。さらに、倒立顕微鏡下に線維芽細胞に重層させた KG-2 細胞を観察すると KG-2 細胞は腎および肺由来線維芽細胞を破壊し線維芽細胞の間へ侵入するのが観察される

のに対し、皮膚由来線維芽細胞が破壊することなく pile up して増殖するのが観察された。この現象は KG-2 細胞と線維芽細胞同時培養系における type IV collagenase 産生量の多寡をよく反映していた。これらのことは、線維芽細胞といえどもそれぞれの臓器により特異性があり腎細胞癌にとっては orthotopic site である腎および転移好発部である肺由来の線維芽細胞転移に重要な役割を果たしていると考えられた。

最近、諸家により各種 growth factor および cytokine が癌細胞におよぼす影響について報告されている<sup>10-13</sup>。Welch ら<sup>11</sup>は TGF $\beta_1$  を作用させたラット乳癌細胞では 72 KDa および 92 KDa の type IV collagenase 産生が著明に促進されており、尾静脈からこれらの細胞を注入したところ TGF- $\beta_1$  を作用させてないものと比べ著しく肺転移巣が増大したと報告している。さらに Folkman<sup>12</sup>、および Liotta ら<sup>13</sup>は bFGF は、血管内皮細胞の増殖および遊走を促進し、血管内皮細胞の type IV collagenase および urokinase の産生を促進すると報告した。また HGF は、正常および transform された上皮細胞の遊走を促進するとされている<sup>14</sup>。今回われわれは線維芽細胞が産生するとされる cytokine および growth factor が KG-2 細胞の type IV collagenase 産生能におよぼす影響を検討したところ bFGF、TGF- $\beta_1$  および HGF はいずれも比較的低濃度で KG-2 細胞の type IV collagenase 産生を促進した。しかし、これら抗体を用いて各種線維芽細胞におけるこれら growth factor の発現を検討したところ bFGF および HGF では線維芽細胞間で発現に差を認めなかったが、TGF- $\beta_1$  は腎および肺由来線維芽細胞の細胞質に非常に強く発現を認めたのに対し皮膚由来線維芽細胞ではほとんど認めなかった。これらのことは KG-2 細胞を用いたヌードマウス転移モデルにおいて、転移能の差は各臓器由来の線維芽細胞が産生する TGF- $\beta_1$  が非常に重要な役割を果たしていると考えられた。今後 TGF- $\beta_1$  の中和抗体あるいは TGF- $\beta_1$  の receptor に作用し細胞増殖を抑制する suramine 等が腎細胞癌の転移抑制に有用か否か本腫瘍転移モデルを用いて検討を加える予定である。

## 結 語

ヒト腎細胞癌の転移には腎および肺由来線維芽細胞が分泌する TGF- $\beta_1$  により調節を受ける type IV collagenase が重要な役割を演じていると思われた。

## 文 献

- 1) Gohji K, Nakajima M, Dinney CPN, et al.: The importance of orthotopic implantation to the isolation and biological characterization of a metastatic human clear cell renal carcinoma in nude mice. *Int J Clin Oncol* 2: 23-32, 1993
- 2) Naito S, von Eschenbach AC, Giavazzi R, et al.: Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. *Cancer Res* 46: 4109-4115, 1986
- 3) Nakajima M, Morikawa K, Fabra A, et al.: Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colon carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 82: 1890-1898, 1990
- 4) Nicolson GL: Cancer metastasis; tumor cell and host organ properties important in metastasis of specific secondary sites. *Biochem Biophys Acta* 948: 175-224, 1988
- 5) Nakajima M and Chop AM: Tumor invasion and extracellular matrix degradative enzymes: regulation of activity by organ factors. *Semin Cancer Biol* 2: 115-127, 1991
- 6) Morikawa K, Walker SM, Nakajima M, et al.: Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res* 48: 6863-6871, 1988
- 7) Stephenson RA, Dinney CPN, Gohji K, et al.: Metastatic model from human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 84: 951-957, 1992
- 8) Paget S: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1: 571-573, 1989
- 9) Nakajima M, Welch DR, Belloni PN, et al.: Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. *Cancer Res* 47: 4869-4876, 1987
- 10) Postlethwaite AE, Lachman LB, Mainardi CL, et al.: Interleukin-1 stimulation of collagenase production by cultured fibroblasts. *J Exp Med* 157: 801-806, 1983
- 11) Welch DR, Fabra A and Nakajima M: Transforming growth factor-beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7678-7682, 1990
- 12) Folkman J and Klagsburn M: Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447, 1987
- 13) Liotta A, Steeg PC and Stetler-Stevenson W: Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulations. *Cell* 64: 327-336, 1991
- 14) Presta M, Moscatelli D, Joseph-Silverstein J, et al.: Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol Cell Biol* 6: 4060-4066, 1986

(Received on June 1, 1994)

(Accepted on June 7, 1994)

(迅速掲載)